

## ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ У РАСТЕНИЙ ОЗИМОГО РАПСА ЭНДОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

И. А. ГРИНЕВА<sup>1)</sup>, В. А. ЛОМОНОСОВА<sup>1)</sup>, Д. В. МАСЛАК<sup>1)</sup>,  
И. А. РУССКИХ<sup>2)</sup>, Л. Е. САДОВСКАЯ<sup>1)</sup>, Т. Л. СКАКУН<sup>1)</sup>,  
И. Н. ФЕКЛИСТОВА<sup>1)</sup>, Н. П. МАКСИМОВА<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Республиканский центр экологии и краеведения, ул. Макаенка, 8, 220114, г. Минск, Беларусь

В результате проведения экспериментов по исследованию индукции устойчивости у растений озимого рапса в условиях солевого стресса установлено, что обработка их эндофитными бактериальными штаммами 12 (выделен из зерна кукурузы), R13 (выделен из корней тритикале) и 22 (выделен из корней ржи) существенно увеличивает выживаемость, длину и массу побегов растений. Отобранные эндофитные штаммы являются перспективными для создания на их основе фитопротекторного бактериального биопрепарата.

**Ключевые слова:** эндофитные бактерии; солевой стресс; системная устойчивость; озимый рапс.

**Благодарность.** Работа выполнена в рамках задания 3.17 «Отбор и характеристика высокоактивных антибиотикопродуцирующих эндофитных бактерий, обладающих фитостимулирующим действием, с целью создания нового средства защиты овощных и технических культур» подпрограммы «Микробные биотехнологии» государственной программы научных исследований «Биотехнологии» на 2016–2020 гг.

### Образец цитирования:

Гринева ИА, Ломоносова ВА, Маслак ДВ, Русских ИА, Садовская ЛЕ, Скаакун ТЛ, Феклистова ИН, Максимова НП. Повышение устойчивости к солевому стрессу у растений озимого рапса эндофитными бактериями. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:112–117.

<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-112-117>

### Авторы:

**Ирина Александровна Гринева** – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

**Вероника Александровна Ломоносова** – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

**Диана Викторовна Маслак** – заведующий сектором молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

**Иван Анатольевич Русских** – заведующий лабораторией.

**Людмила Евгеньевна Садовская** – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

**Татьяна Леонидовна Скаакун** – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

**Ирина Николаевна Феклистова** – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

**Наталья Павловна Максимова** – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

### For citation:

Grineva IA, Lomonosova VA, Maslak DV, Russkikh IA, Sadovskaya LE, Skakun TL, Feklistova IN, Maksimova NP. Improving resistance to salt stress by endophytic bacteria in winter rape plants. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:112–117. Russian.

<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-112-117>

### Authors:

**Irina A. Grineva**, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

*grineva@mail.ru*

**Veronika A. Lomonosova**, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

*nikaglad@gmail.com*

**Diana V. Maslak**, head of the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

*diana-maslak@yandex.ru*

**Ivan A. Russkikh**, head of the laboratory.

*herehue@gmail.com*

**Ludmila E. Sadovskaya**, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

*ludmilasadovskaya@rambler.ru*

**Tatyana L. Skakun**, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

*stanysik@yandex.ru*

**Irina N. Feklistova**, PhD (biology); head of the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

*feclistova\_iren@rambler.ru*

**Natalya P. Maksimova**, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

*nataliamaximova@yahoo.com*

## IMPROVING RESISTANCE TO SALT STRESS BY ENDOPHYTIC BACTERIA IN WINTER RAPE PLANTS

I. A. GRINEVA<sup>a</sup>, V. A. LOMONOSOVA<sup>a</sup>, D. V. MASLAK<sup>a</sup>,  
I. A. RUSSKIKH<sup>b</sup>, L. E. SADOVSKAYA<sup>a</sup>, T. L. SKAKUN<sup>a</sup>,  
I. N. FEKLISTOVA<sup>a</sup>, N. P. MAKSIMOVA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus  
<sup>b</sup>Republican Center of Ecology and Local Studies, 8 Makajonka Street, Minsk 220114, Belarus  
Corresponding author: I. A. Grineva (grineva@mail.ru)

As a result of laboratory experiments to study the induction of systemic resistance in winter rape plants under conditions of salt stress, it was found that treatment of plants with endophytic bacterial strains 12 (isolated from corn grain), R13 (isolated from triticale roots) and 22 (isolated from rye roots) significantly increases the survival rate, length and weight of plant shoots. The selected endophytic strains are promising for the creation of a phytoprotective bacterial biological preparation on their basis.

**Keywords:** endophytic bacteria; salt stress; systemic resistance; winter rape.

**Acknowledgements.** This work was carried out within the framework of task 3.17 «Selection and characterization of highly active antibiotic-producing endophytic bacteria with phytostimulating action in order to create a new means of protection for vegetable and industrial crops» of the subprogram «Microbial biotechnologies» of the state program of scientific research «Biotechnologies» for 2016–2020.

### Введение

Интерес к экологизации сельского хозяйства в последние годы возрастает во всем мире, что обусловлено заботой о здоровье человека и стремлением замедлить вредное влияние общества на окружающую среду. В растениеводстве работники агропромышленного комплекса и ученые стремятся сохранить и приумножить урожай сельскохозяйственных культур, одновременно снизив или исключив пестицидную нагрузку и уменьшив количество вносимых удобрений. В Республике Беларусь подобное направление деятельности поддержано на законодательном уровне. Так, в 2019 г. вступил в силу Закон Республики Беларусь от 9 ноября 2018 г. № 144-З «О производстве и обращении органической продукции». Одним из путей получения органических продуктов является применение в растениеводстве биологических препаратов на основе микроорганизмов, способных проявлять целый комплекс хозяйственно полезных свойств.

Эндофитные бактерии – группа PGPR-бактерий, которые не образуют какие-либо специфические структуры у растений и мутуалистически существуют внутри растительных тканей, что делает их менее зависимыми от факторов внешней среды и одновременно с этим позволяет активно влиять на растение-хозяина. Изучение эндофитных бактерий актуально, так как они обладают широким спектром хозяйственно полезных свойств: стимулируют рост растений, улучшают их питание, проявляют антифунгальную и антибактериальную активность, борются с нематодами и насекомыми, существенно увеличивают продуктивность сельскохозяйственных культур, повышают устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Учеными было показано, что инокуляция растений эндофитными бактериями способствует благополучному перенесению растениями абиотических стрессов, таких как засоление, засуха, низкие температуры, чрезмерное оводнение, содержание в почве поллютантов. Установлено, что используемые в экспериментах эндофитные бактерии повышают устойчивость растений-хозяев посредством нескольких механизмов: влияния на изменение метаболизма, уровня фитогормонов и морфологии растений, накопления протекторных молекул, индукции системной устойчивости ISR-типа [1–3].

В литературных источниках описано значительное количество родов и видов эндофитных бактерий у сельскохозяйственных растений. Исследования, использующие современные технологии, позволяют идентифицировать даже те эндофитные микроорганизмы, которые не могли быть выделены посевом стерилизованных растительных тканей на питательные среды. Однако для нужд биотехнологии наибольший интерес представляют культивируемые эндофитные штаммы (так называемые факультативные эндофиты), имеющие в жизненном цикле этап существования за пределами растения-хозяина [1; 2].

Внутренняя среда здоровых растений чаще всего населена не монокультурой микроорганизмов, а совокупностью эндофитов. Причем эндофитное сообщество находится в настолько тесном и активном взаимодействии с растением-хозяином, что обуславливает формирование у последнего МАР-фенотипа (*microbiome-associated phenotype*). Тенденцией исследований последних лет является изучение и прогнозирование взаимодействия сельскохозяйственных растений не только с отдельными эндофитными штаммами, но и с различными микробными эндофитными консорциумами [1].

Известно, что эндофитные бактерии не обладают высокой специфичностью и могут передаваться как горизонтально между соседними растениями, так и вертикально из поколения в поколение с семенами и пыльцой, причем установлено повышение частоты передачи эндофитных бактерий у растений в стрессовых условиях [1].

Совокупность указанных выше фактов позволяет создавать эффективные биологические препараты пролонгированного действия на основе эндофитных бактерий для органического земледелия. Применение подобных биопрепараторов в сельском хозяйстве требует меньших затрат, чем использование пестицидов и удобрений, но при этом дает значительный стимулирующий и защитный эффект, не оказывая негативного влияния на биоразнообразие и плодородие почв, здоровье человека.

Целью данного исследования было изучение возможности повышать устойчивость модельного объекта озимого рапса к абиотическому стрессу – засолению ростовой среды раствором  $\text{NaCl}$  – за счет обработки эндофитными бактериями.

### Материалы и методы исследования

Для получения лабораторных образцов бактериальных культур штаммы из коллекции эндофитных нефитопатогенных бактерий НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ [4] выращивали на круговом шейкере в картофельном бульоне в течение 48 ч при 28 °C. Для приготовления картофельного бульона к 300 мл измельченного картофеля добавляли 1000 мл дистиллированной воды, отваривали до готовности и фильтровали. Стерилизацию осуществляли автоклавированием при 1,52 бара на протяжении 0,5 ч.

В качестве модели для изучения способности эндофитных бактерий индуцировать устойчивость растений к абиотическим неблагоприятным факторам окружающей среды в лабораторных условиях был выбран сорт озимого рапса Зорны, выращиваемый при засолении ростовой агаризованной среды

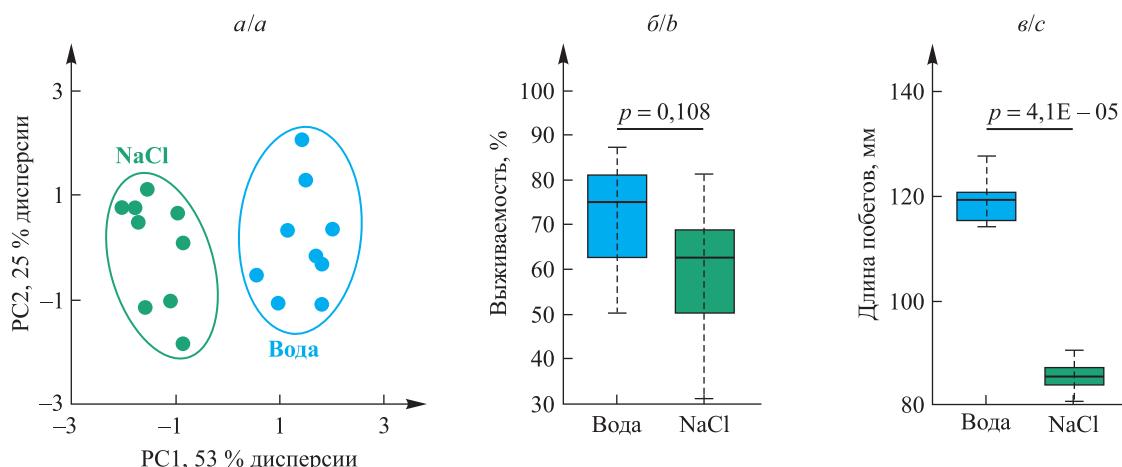


Рис. 1. Точечная диаграмма распределения двух контрольных групп растений рапса (а), а также бокс-плоты выживаемости (б) и длины побегов (в) растений рапса при засолении 150 ммоль/л  $\text{NaCl}$  и в его отсутствие.

На рисунках б и в приведены боксы, отсекающие верхний и нижний квартили распределения данных, медиана распределения обозначена жирной горизонтальной линией внутри каждого бокса, усы указывают крайние (минимальные и максимальные) значения выборок, уровень значимости  $p$  рассчитан с помощью двухстороннего двухвыборочного  $t$ -теста

Fig. 1. Scatterplot demonstrating the distribution of rapeseed plants from two control groups (a), and boxplots showing the survival (b) as well as sprout length (c) in rapeseed plants under normal water or 150 mmol/L  $\text{NaCl}$  treatment conditions. Boxplots in figures b and c include minimum (lower whisker), first quartile (lower bound of box), median (horizontal bold line inside box), third quartile (upper bound of box), interquartile range (box) and maximum (upper whisker);  $p$ -values were calculated with two-sided two-sample Student's  $t$ -test

Кнопа раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л. Подготовленные бактериальные супензии (0,2 мл бактериальной супензии, разведенной в 10 раз стерильной водопроводной водой) вносили в сосуды с 17,8 мл теплой (45 °C) агаризованной среды Кнопа (1 %), туда же добавляли по 2 мл концентраты NaCl (1500 ммоль/л, или 87,66 г/л NaCl) и перемешивали. На поверхность застывшей среды каждого сосуда раскладывали семена рапса, проращивали их в темноте 3 сут при 20 °C, затем растили на свету в светотеплице 16–17 сут при 20 °C, закрыв стерильным стеклянным колпаком. В качестве контроля № 1 использовали растения, в ростовую среду которых вместо концентратов NaCl внесли стерильную водопроводную воду, а в качестве контроля № 2 – растения, в питательной среде которых супензию бактерий заменили 0,2 мл картофельного бульона, разведенного в 10 раз стерильной водопроводной водой. Эксперименты были поставлены в 3-кратной повторности, количество вегетационных сосудов в каждом варианте эксперимента составляло не менее трех. В ходе эксперимента оценивали выживаемость, длину, сырую и сухую массу побегов растений рапса. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе *Microsoft Excel*, а также среде программирования *R*.

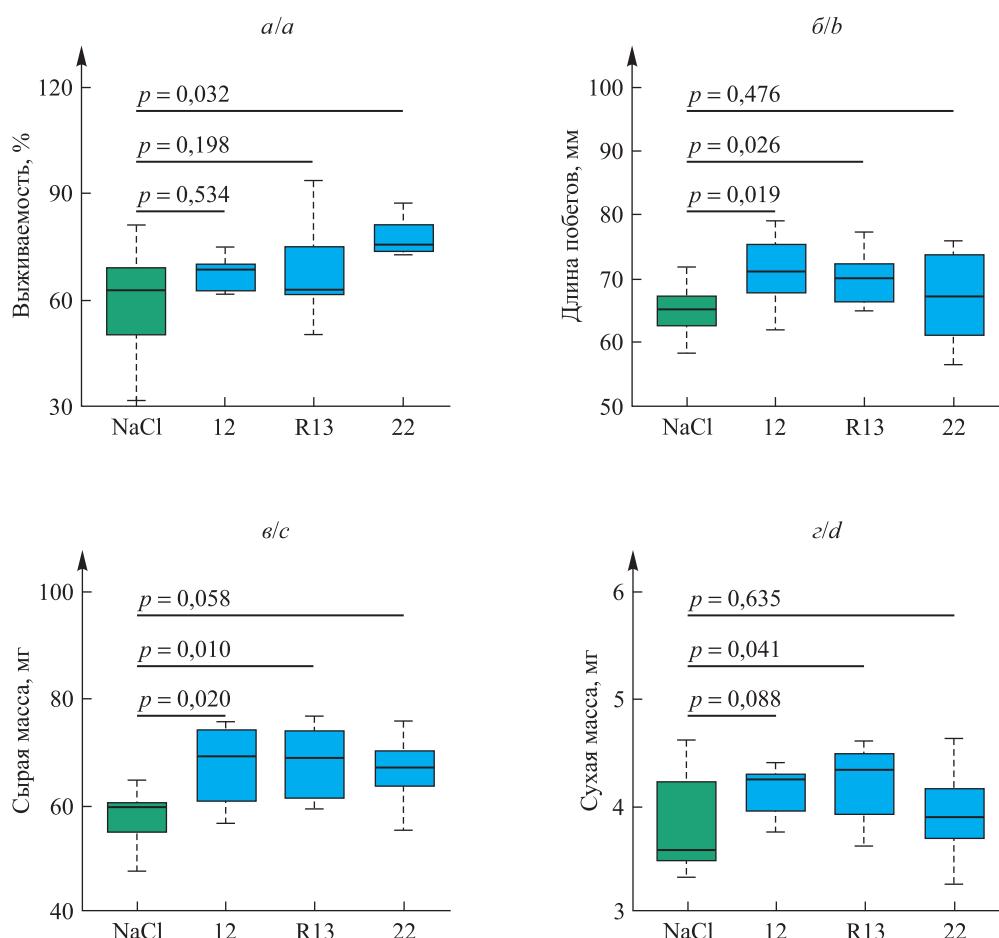


Рис. 2. Выживаемость (а), длина (б), сырая (в) и сухая (г) масса побегов рапса при обработке растений штаммами эндофитных бактерий 12, R13 и 22 в условиях засоления 150 ммоль/л NaCl.

На рисунке представлены боксы, отсекающие верхний и нижний квартили распределения данных, медиана распределения обозначена жирной горизонтальной линией внутри каждого бокса, усы указывают крайние (минимальные и максимальные) значения выборок, уровень значимости *p* рассчитан с помощью двухстороннего двухвыборочного *t*-теста

Fig. 2. Survival (a), sprout length (b), wet (c) and dry (d) mass of sprouts of the rapeseed plants following endophytic bacteria strains 12, R13 or 22 treatment under 150 mmol/L NaCl saline conditions. Boxplots include minimum (lower whisker), first quartile (lower bound of box), median (horizontal bold line inside box), third quartile (upper bound of box), interquartile range (box) and maximum (upper whisker); *p*-values were calculated with two-sided two-sample Student's *t*-test

## Результаты и их обсуждение

В исследовании были изучены 10 штаммов бактерий-эндофитов (7, 9, 12, 16, 22, 39, 41, 43, Э33 и R13). Их влияние на устойчивость рапса к засолению оценивалось по четырем признакам (параметрам или характеристикам): выживаемости растений, их длине, а также сырой и сухой массе побегов. При этом первоначальный дизайн исследования предполагал два контроля: добавление к ростовой среде стерильной водопроводной воды или же 1500 ммоль/л концентрату NaCl.

С помощью метода главных компонент – стандартного метода многомерной статистики, одновременно учитывавшего все признаки, по которым описывались растения в нашем исследовании, – мы определили, что две контрольные группы растений четко различаются между собой (рис. 1, *a*). Изучение же каждого из признаков в отдельности показало, что неблагоприятный абиотический фактор (засоление ростовой среды 150 ммоль/л NaCl) достоверно снижает только длину побегов у контрольных растений рапса сорта Зорны по сравнению с рапсом, выращенным в отсутствие этого повреждающего фактора (см. рис. 1, *b*). По остальным признакам мы наблюдали заметное, но все же статистически недостоверное их снижение при засолении (как, например, в случае выживаемости (см. рис. 1, *b*)). Эти результаты показывают, что для дальнейших сравнительных исследований целесообразнее использовать контроль с добавлением к ростовой среде 1500 ммоль/л концентрату NaCl. Кроме того, очевидно, что метод главных компонент позволяет уловить четкие различия между сравниваемыми группами растений по совокупности всех изучаемых признаков, тогда как сравнение по отдельным признакам не всегда дает однозначный результат.

Дальнейший сравнительный анализ показал, что обработка растений 3 штаммами бактерий-эндофитов (из 10 изученных) достоверно повышает выраженность некоторых из исследуемых признаков у рапса в условиях засоления. Так, внесение бактерий штамма 12 достоверно увеличивает длину побегов рапса, выращенного при засолении, на 12,8 %, а сырую массу побегов – на 14,8 %. Клетки штамма R13 благоприятно воздействуют на длину, сырую и сухую массу побегов (рост на 9,8; 16,1 и 11,3 % соответственно), что продемонстрировано на рис. 2. Клетки штамма 22 повышают выживаемость растений при засолении на 16 %. Эти результаты свидетельствуют о том, что некоторые бактерии-эндофиты могут индуцировать повышенную устойчивость рапса к такому неблагоприятному фактору, как засоление.

Однако поскольку, опираясь на отдельные признаки, не всегда можно однозначно сказать, каково же совокупное влияние бактерий на растения (по одному признаку могут быть изменения, а по другим – нет), то мы воспользовались возможностями метода главных компонент, чтобы оценить

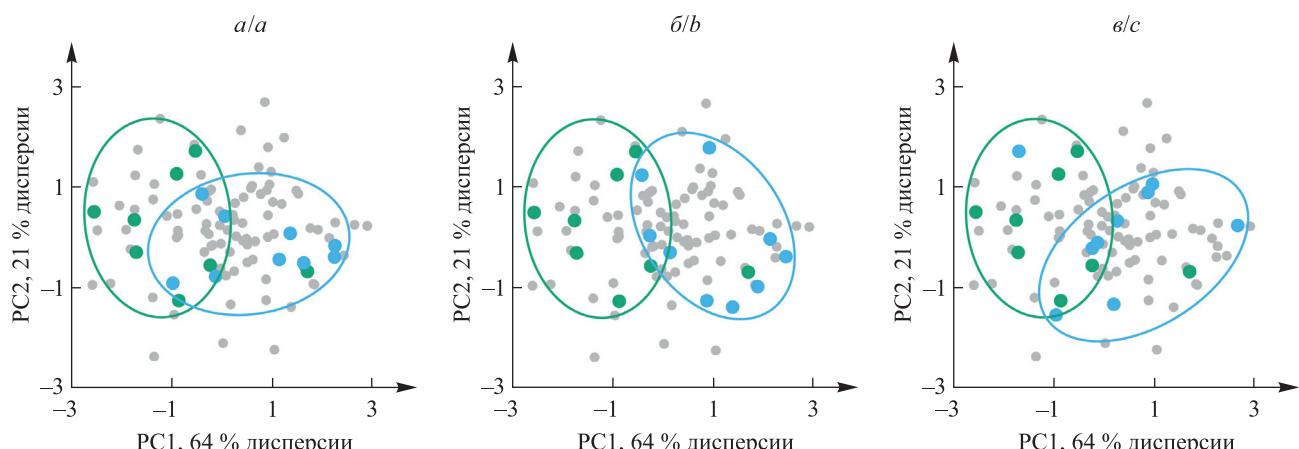


Рис. 3. Точечные диаграммы распределения контрольных и экспериментальных растений рапса, обработанных бактериальными эндофитными штаммами 12 (*a*), R13 (*b*) и 22 (*c*) при засолении 150 ммоль/л NaCl.

Все растения рапса, участвующие в эксперименте, обозначены серым цветом (●), контрольные растения – зеленым (●), а экспериментальные – голубым (●).

Диаграммы рассчитаны с помощью метода главных компонент по совокупности всех изученных в эксперименте параметров растений

Fig. 3. Scatterplots of control and experimental rapeseed plants following endophytic bacteria strains 12 (*a*), R13 (*b*) or 22 (*c*) treatment under 150 mmol/L NaCl saline conditions.

The gray dots (●) represent the entire set of rapeseed plants enrolled in the study.

A subset of control plants is marked in green (●) and experimental ones are blue (●).

These plots are based on linear approximation of all investigated features of the rapeseed plants using principal component analysis

влияние штаммов бактерий-эндофитов на растения рапса сразу по всем исследуемым признаком. Как видно на рис. 3, внесение бактериальных эндофитных штаммов 12 (см. рис. 3, *a*), R13 (см. рис. 3, *b*) и 22 (см. рис. 3, *c*) в агаризованную среду Кнопа приводит к такому совокупному изменению учитываемых в эксперименте признаков растений, что на точечных диаграммах рассеяния эти растения располагаются достаточно компактно (точки голубого цвета справа) и лишь в незначительной степени перекрываются с областями, занимаемыми контрольными растениями в условиях засоления (точки зеленого цвета слева). По другим штаммам мы не наблюдали столь надежного разделения контрольных и экспериментальных групп растений. Эти результаты, по нашему мнению, согласуются с результатами, описанными выше, и подтверждают способность бактериальных эндофитных штаммов 12, R13 и 22 эффективно индуцировать устойчивость к засолению у растений озимого рапса.

### Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований из 10 протестированных эндофитных бактерий отобраны штаммы 12 (выделен из зерна кукурузы сорта Гитаго), R13 (выделен из корней трикале сорта Дубрава) и 22 (выделен из корней ржи), которые повышали устойчивость к засолению 150 ммоль/л NaCl у растений озимого рапса. Впоследствии планируется изучить механизмы, лежащие в основе благоприятного влияния инокуляции эндофитными бактериями на растения рапса при засолении. Отобранные эндофитные штаммы являются перспективными для дальнейшего исследования и создания на их основе фитопротекторного бактериального биопрепарата.

### Библиографические ссылки

1. Васильева ЕН, Ахтемова ГА, Жуков ВА, Тихонович ИА. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве. *Экологическая генетика*. 2019;17(1):19–32. DOI: 10.17816/ecogen17119-32.
2. Miliute I, Buzaitė O, Baniulis D, Stanys V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2015;102(4):465–478. DOI: 10.13080/z-a.2015.102.060.
3. Firdous J, Lathif NA, Mona R, Muhamad N. Endophytic bacteria and their potential application in agriculture: a review. *Indian Journal of Agricultural Research*. 2019;53(1):1–7. DOI: 10.18805/IJARe.A-366.
4. Гринева ИА, Савчик АВ, Ломоносова ВА, Маслак ДВ, Кулешова ЮМ, Садовская ЛЕ и др. Выделение штаммов эндофитных бактерий, перспективных для создания фитозащитных биопрепараторов, и изучение их антагонистических свойств. В: Маслак ДВ, редактор. *Биологически активные препараты для растениеводства. Научное обоснование – рекомендации – практические результаты. Материалы XIV Международной научно-практической конференции; 3–8 июля 2018 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2018. с. 69–71.

### References

1. Vasileva EN, Akhtemova GA, Zhukov VA, Tikhonovich IA. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture. *Ecological Genetics*. 2019;17(1):19–32. Russian. DOI: 10.17816/ecogen17119-32.
2. Miliute I, Buzaitė O, Baniulis D, Stanys V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2015;102(4):465–478. DOI: 10.13080/z-a.2015.102.060.
3. Firdous J, Lathif NA, Mona R, Muhamad N. Endophytic bacteria and their potential application in agriculture: a review. *Indian Journal of Agricultural Research*. 2019;53(1):1–7. DOI: 10.18805/IJARe.A-366.
4. Grineva IA, Savchik AV, Lomonosova VA, Maslak DV, Kuleshova YuM, Sadovskaya LE, et al. [Isolation of strains of endophytic bacteria, promising for the creation of phytoprotective biological products, and the study of their antagonistic properties]. In: Maslak DV, editor. *Biologicheski aktivnye preparaty dlya rastenievodstva. Nauchnoe obosnovanie – rekomendatsii – prakticheskie rezul'taty. Materialy XIV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 3–8 iyulya 2018 g.; Minsk, Belarus'* [Biologically active drugs for crop production. Scientific justification – recommendations – practical results. Materials of the 14<sup>th</sup> International scientific-practical conference; 2018 July 3–8; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2018. p. 69–71. Russian.

Статья поступила в редакцию 28.08.2020.  
Received by editorial board 28.08.2020.